

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO NA ÁREA DE REPRODUÇÃO ANIMAL

Curitibanos

2018

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Rurais
Medicina Veterinária



Andrye da Silva

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO NA ÁREA DE REPRODUÇÃO ANIMAL

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Ciências Rurais, Campus Curitibanos, da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Medicina Veterinária.
Orientador: Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta.

Curitibanos

2018

Ficha de identificação da obra

A ficha de identificação é elaborada pelo próprio autor.

Orientações em:

<http://portalbu.ufsc.br/fich>

a

Andrye da Silva

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO NA ÁREA DE
REPRODUÇÃO ANIMAL**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Medicina Veterinária” e aprovado em sua forma final.

Curitibanos, 22 de novembro de 2018.

Prof. Dr. Alexandre de Oliveira Tavela
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta
Orientador
Universidade UFSC

Prof. Dr. Giuliano Moraes Figueiró
Universidade UFSC

Prof. Dr. Luiz Ernani Henkes
Universidade UFSC

Dedico este trabalho aos meus pais, minha irmã e a São Francisco de Assis.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A São Francisco de Assis, o meu São Chiquinho, que me guia, ilumina e protege. Aquele que pelo seu amor me fez seguir este caminho.

Aos meus pais, que me deram a vida e lutam incansavelmente pelo meu futuro. Pelo amor, proteção e por serem sempre aconchego e abrigo. Pelo incentivo nas horas de dúvida, pelo amparo na hora que as lágrimas não puderam ser contidas, por sorrirem e comemorarem comigo cada vitória alcançada.

A minha irmã, pelo amor e carinho. Por acreditar em mim e me incentivar a cada dia ser melhor.

Aos meus avós pelo amor, dedicação e proteção à distância. Pelas lágrimas de saudade que serviram de impulso, por me ensinar a amar os animais e por realizar em mim esse sonho de se dedicar a eles.

A minha família, por me apoiar e incentivar.

A minha amiga irmã Diana, por acreditar e me incentivar em todos os momentos. Pela nossa sintonia de alma. Por ser ombro amigo e companheira de loucuras (e amores). Por ser família e amor.

A minha amiga Larissa, por ser minha família durante a faculdade e me dar uma segunda família de coração. Por compartilhar desse sonho comigo (mesmo sendo de áreas tão diferentes), pela nossa amizade e cumplicidade.

A Jordana, Fernanda, Marian, Claudia e Brenda, por serem uma mistura de abrigo, loucura e estudos nessa vida acadêmica. Que a gente leve sempre em nossos corações essa amizade linda que construímos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta, por ser um exemplo de profissional.

A Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) Campus Botucatu e a Equicenter Reprodução Agropecuária LTDA, pela oportunidade de estagiar e ampliar meus conhecimentos.

A aqueles que um dia me apoiaram e incentivaram de alguma forma.

E, principalmente, aqueles que duvidaram que aquela menininha arteira rodeada por todos os tipos de animais, um dia seria Médica Veterinária. Meu muito obrigada, vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui!

“Antes de ter amado um animal, parte da nossa alma permanece desacordada.”
(Anatole France)

RESUMO

Esse relatório descreve as atividades acompanhadas e desenvolvidas na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) Campus Botucatu no período de 05 de julho a 31 de agosto de 2018 e na da Equicenter Reprodução Agropecuária LTDA de 12 de setembro a 12 de outubro de 2018, totalizando uma carga horária de 504 horas normais e 96 horas de plantões. As supervisões foram da médica veterinária e professora doutora Fabiana Ferreira de Souza na UNESP e da médica veterinária Rafaela de Fátima Soares na Equicenter. Durante a realização do estágio foram desenvolvidas atividades em grandes e pequenos animais, como coleta seminal por vagina artificial e digital, espermiogramas, controles foliculares, acompanhamentos gestacionais, clínica de neonatos entre outros. No decorrer do estágio a acadêmica conseguiu pôr em prática todo o conhecimento adquirido durante a graduação e adquirir novos na área da reprodução animal.

Palavras-chave: Estágio. Reprodução animal. Medicina veterinária.

ABSTRACT

This report describes the activities followed and developed at the Paulista State University "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) Campus Botucatu from July 5th to August 31st, 2018, and at the Equicenter Reprodução Agropecuária LTDA from September 12nd to October 12nd, 2018, adding up an hourly load of 504 normal hours, and 96 hours of work shifts. Supervisors were veterinarian and Professor Fabiana Ferreira de Souza at UNESP and veterinarian Rafaela de Fátima Soares at Equicenter. Along the internship, activities were performed in large and small animals, such as seminal collection by artificial and digital vagina, spermograms, follicular controls, gestational follow-ups, neonatal clinic, among others. During the internship, the academic was able to put into practice the overall knowledge acquired during graduation and obtained new ones in the area of animal reproduction.

Keywords: Internship. Animal reproduction. Veterinary medicine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Piquetes da Equicenter Reprodução Agropecuária LTDA	16
Figura 2 - Baías da Equicenter Reprodução Agropecuária LTDA	17
Figura 3 - Laboratório Equicenter Reprodução Agropecuária LTDA.....	17
Figura 4 - Vagina artificial modelo Botucatu com mucosa plástica acoplada e copo isotérmico com proteção à exposição solar	20
Figura 5 - BotuIA® com sêmen diluído	22
Figura 6 - Câmara de Neubauer	23
Figura 7 - Teste de eosina-nigrosina	24
Figura 8 - Teste Karras modificado	25
Figura 9 - Análise morfológica utilizando o sistema automatizado DIC.....	25
Figura10 - Imagem ultrassonográfica de um útero com pregas endometriais alargadas, referente a edema 3 e presença de pequena quantidade de líquido no lúmen.....	32
Figura 11 - Imagem ultrassonográfica de gônada masculina homogênea e apresentando linha do mediastino de um feto equino, identificada pela seta	35
Figura 12 - Imagem ultrassonográfica de gônada feminina com estrutura ecogênica circular circundada por um halo hipoecogênico central de um feto equino, identificada pela seta	35
Figura 13 - Citologia vaginal de cadela demonstrando células superficiais queratinizadas e intermediárias grandes (final do proestro e início do estro).....	37
Figura 14 - Imagem ultrassonográfica de genitália feminina em feto canino, identificada pela seta	39
Figura 15 - Desobstrução das vias aéreas e massagem para pressão positiva em neonato canino.	40
Figura 16 - Oxigenioterapia em máscaras adaptadas em neonatos felinos	40
Figura 17 - Aquecimento de neonato canino com luva de procedimento preenchida com água morna	41
Figura 18 - Alimentação artificial por meio de mamadeiras em neonato canino	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades acompanhadas (A) e desenvolvidas (D) durante estágio curricular obrigatório em medicina veterinária na espécie equina	18
Tabela 2 - Atividades acompanhadas (A) e desenvolvidas (D) durante estágio curricular obrigatório em medicina veterinária em pequenos animais, caninos e felinos	19
Tabela 3 - Espermogramas provenientes de 3 coletas com vagina artificial do animal identificado como BH3.....	26
Tabela 4 - Espermograma de garanhão da raça quarto de milha (QM) adulto	27
Tabela 5 - Testes com diferentes diluentes nos ejaculados citados na Tabela 4.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acompanhadas (A)
Batimentos por minuto (bpm)
Brasileiro de hipismo (BH)
Centímetros (cm)
Análise computadorizada do movimento espermático (CASA)
Concentração espermática ([\cdot])
Corpo lúteo (CL)
Defeitos maiores (DMa)
Defeitos menores (DMe)
Diagnóstico de gestação (DG)
Diâmetro biparietal (DB)
Densidade (ρ)
Desenvolvidas (D)
Espermatozoides rápidos (RPA)
Força Gravitacional (G) Gramas
(g)
Gonadotrofina coriônica humana (hCG)
Hiperplasia prostática benigna (HPB)
Horas (h)
Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH)
Idade gestacional (IG)
Inseminação artificial (IA)
Integridade de membrana plasmática (IM)
Intramuscular (IM)
Mangalarga marchador (MM)
Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC)
Mililitros (ml)
Milímetros (mm)
Minuto (min)
Motilidade espermática (ME)

Motilidade Total (MT)

Motilidade progressiva (MP)

Neutrófilos (N)

Progesterona (P₄)

Prostaglandina (PGF₂ α)

Quarto de milha (QM)

Segundos (s)

Unidade Internacional (UI)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

Velocidade curvilinear (VCL)

Velocidade progressiva (VSL)

Velocidade de trajeto (VAP)

Volume (V)

LISTA DE SÍMBOLOS

Maior igual \geq

Proporção :

Porcento %

Micrômetro μm

Graus Celsius $^{\circ}\text{C}$

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	DESCRIÇÕES DOS LOCAIS DE ESTÁGIO	16
3	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	17
3.1	REPRODUÇÃO EM GRANDES ANIMAIS	19
3.1.1	Exame andrológico	19
3.1.2	Coletas de sêmen e espermiograma de equinos	20
3.1.3	Controle folicular e intervenções no ciclo estral	31
3.1.4	Inseminação artificial	33
3.1.5	Diagnóstico de gestação	34
3.1.6	Sexagem fetal	34
3.2	REPRODUÇÃO EM PEQUENOS ANIMAIS	35
3.2.1	Coleta de sêmen e espermiograma	35
3.2.2	Avaliação do período estral	36
3.2.3	Inseminação artificial	37
3.2.4	Diagnóstico de gestação	38
3.2.5	Acompanhamento gestacional	38
3.2.6	Sexagem fetal	38
3.2.7	Exame clínico do neonato	39
3.2.8	Neoplasias mamárias	42
4	CONCLUSÃO	44

1 INTRODUÇÃO

A reprodução animal na sua forma natural é limitada pela capacidade de cada uma das espécies. Mesmo em livre demanda, os machos apresentam uma eficiência restrita ao número de coberturas. Em relação às fêmeas, essa barreira é definida pelo número de progênes possíveis em um determinado período de tempo.

Baseadas nesses aspectos fisiológicos limitantes, é que técnicas reprodutivas podem ser aplicadas a várias espécies animais para manejo estratégico ou conservativo (SWANSON; WILDT, 1997). Propiciando o uso de material genético de indivíduos inférteis, idosos, com patologias que impossibilitam a reprodução ou em fases terminais da doença, após a morte e de animais localizados em propriedades muito distantes que se tornam economicamente inviáveis para a obtenção de produtos. Além de possibilitar o diagnóstico e tratamento de causas de subfertilidades ou infertilidades com a maior compreensão da fisiologia reprodutiva de cada espécie animal.

Dentre as biotécnicas reprodutivas utilizadas atualmente, a inseminação artificial, a superovulação e a transferência de embrião, por acelerarem a seleção genética, vêm sendo utilizadas em larga escala (TAVEIROS, 2000; TAVEIROS et al., 2003). Segundo informações da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), o Brasil é líder mundial no emprego da técnica de transferência de embriões equinos, somente em 2010, foram transferidos 12.422 embriões, o que equivale a cerca de 43% de todos os embriões transferidos no mundo (STROUD; BÓ, 2009).

O objetivo deste relatório é apresentar as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular obrigatório de medicina veterinária, na área de reprodução animal, no período de 05 de julho a 31 de agosto na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) Campus Botucatu e de 12 de setembro a 12 de outubro da Equicenter Reprodução Agropecuária LTDA, totalizando 504 horas de atividades e 96 horas de plantões.

2 DESCRIÇÕES DOS LOCAIS DE ESTÁGIO

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) Campus Botucatu, está localizada na cidade de Botucatu, região central do estado de São Paulo. A Universidade conta com a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), que dentre os diversos setores está o Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. O setor de Reprodução Animal conta com os laboratórios de fecundação “in vitro”, didático em reprodução animal, de andrologia e de citologia e morfologia espermática, os centros de estudos em biotecnologia aplicada à reprodução de ovinos e caprinos e de biotecnologia em reprodução equina (CERBEC - Posto de Monta), os ambulatorios para atendimento em grandes animais, e de pequenos animais, sala para aulas e anfiteatro. Os animais destinados a Reprodução Animal totalizam cerca de 40 equídeos. Destes, 13 são éguas, sete garanhões, um jumento e em torno de 19 jumentas os quais, são alojados em piquetes e baias.

O segundo local do estágio curricular foi realizado na Equicenter Reprodução Agropecuária LTDA. Localizada no interior do estado de São Paulo, mais precisamente na zona rural da cidade de Tatuí, região metropolitana de Sorocaba. A central de reprodução é dedicada a equinos de salto da raça brasileiro de hipismo (BH), porém, conta com alguns exemplares da raça quarto de milha. A propriedade é dividida em 42 baias (Figura 2) e 25 piquetes (Figura 1), onde acomoda três garanhões, cerca de 40 éguas doadoras e 72 receptoras, além de um laboratório de reprodução (Figura 3).

Figura 1 - Piquetes da Equicenter Reprodução Agropecuária LTDA.



Fonte: Autora (2018).

Figura 2 - Baías da Equicenter Reprodução Agropecuária LTDA.



Fonte: Autora (2018).

Figura 3 - Laboratório Equicenter Reprodução Agropecuária LTDA.



Fonte: Autora (2018).

3 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o período de estágio curricular obrigatório foram desenvolvidas atividades na área de biotecnologia aplicada a reprodução animal, manejo reprodutivo, atendimento clínico

de neonatos e neoplasias mamárias, em grandes e pequenos animais. Mais especificadamente em equinos (TABELA 1), caninos e felinos (TABELA 2).

Tabela 1 - Atividades acompanhadas (A) e desenvolvidas (D) durante estágio curricular obrigatório em medicina veterinária na espécie equina.

Atividades	A	D	TOTAL
Controle folicular	361	30	391
Coleta de sêmen com vagina artificial	54	02	56
Espermograma	19	06	25
Diagnóstico de gestação	24	00	24
Inseminação artificial	19	00	19
Sexagem fetal	04	00	04
Andrológico	03	00	03
Coleta de sêmen cauda do epidídimo	01	00	01
Congelamento de sêmen	01	00	01
Total	486	38	524

Tabela 2 - Atividades acompanhadas (A) e desenvolvidas (D) durante estágio curricular obrigatório em medicina veterinária em pequenos animais, caninos e felinos.

Atividades	A	D	TOTAL
Clínica de neonatos	11	04	15
Neoplasias mamárias	09	00	09
Acompanhamento gestacional	06	02	08
Coleta de sêmen	01	01	02
Espermograma	02	00	02
Avaliação do período do ciclo estral	01	01	02
Diagnóstico de gestação	02	00	02
Sexagem fetal	01	00	01
Inseminação artificial	01	00	01
Total	34	08	42

3.1 REPRODUÇÃO EM GRANDES ANIMAIS

As práticas desenvolvidas em grandes animais foram todas na espécie equina e realizadas nas duas instituições anteriormente descritas.

3.1.1 Exame andrológico

Os exames andrológicos foram efetuados na UNESP em três animais da raça brasileiro de hipismo (BH), com idades entre dois e três anos, identificados por BH1, BH2, BH3. Os dados do exame não serão mencionados por se tratarem de um experimento de mestrado. Inicialmente foram realizadas as identificações dos animais e do proprietário, seguido do exame físico do animal, que contemplou auscultação cardíaca, respiratória e temperatura retal. Em seguida, foram realizadas observações e palpções em prepúcio, pênis, bolsa escrotal, testículo e epidídimo. Nos testículos foram efetuadas mensurações de maneira individual, que demonstravam simetria, forma, posição, consistência, sensibilidade dolorosa e dimensões (comprimento, largura e altura), que foram auxiliadas pelo uso do paquímetro. Nos epidídimos os parâmetros analisados foram sensibilidade, forma, localização e consistência. Posteriormente foram realizadas palpação retal e avaliação ultrassonográfica. Logo após, foram

realizadas endoscopias do trato genital interno dos animais e coleta de amostras das vesículas seminais para cultura bacteriana e antibiograma, pois a principal suspeita diagnóstica desses animais era vesiculite seminal. Os animais foram devidamente sedados para esses procedimentos. Todo o exame andrológico seguiu rigorosamente as recomendações de Papa et. al., 2014.

3.1.2 Coletas de sêmen e **espermiograma** de equinos

As coletas de sêmen dos garanhões eram realizadas nos dois locais, UNESP e Equicenter, com vagina artificial modelo Botucatu, com mucosa plástica acoplada (Figura 4) e eram preenchidas com água morna, para que permanecessem com temperatura entre 42 e 45°C durante a coleta. Previamente a coleta era efetuada limpeza de pênis e prepúcio com água. Na UNESP, os copos coletores são isotérmicos e com proteção à exposição solar e, internamente inserida a camisa plástica. De maneira oposta, na Equicenter os copos são transparentes e sem proteção térmica e, internamente, eram interligados filtro de nylon e saco plástico descartável. Em ambos os locais, os animais eram condicionados previamente e a monta realizada em um manequim, desviando-se o pênis e introduzindo na vagina artificial. A ejaculação era verificada pelo movimento da cauda para cima e para baixo, sapatear e fluxo pulsátil uretral da ejaculação, concordando com Papa et.al. (2014), que também descreve a contração dos músculos perianais como outra constatação para a ejaculação. A estimulação dos garanhões era realizada com uma fêmea em cio e consequentemente analisada o comportamento sexual (libido) individualmente.

Figura 4 - Vagina artificial modelo Botucatu com mucosa plástica acoplada e copo isotérmico com proteção à exposição solar.



Fonte: Autora (2018).

Imediatamente após a coleta, o ejaculado era armazenado em um recipiente plástico¹ (Figura 5) diluído em diluente a base leite em pó desnatado e antibiótico pré-aquecido em banho-maria a 37°C, em proporção 1:1 quando classificado como aquoso ou 2:1 quando leitoso e filtrado, quando não era realizado no momento da colheita (Equicenter), para a remoção de plasma seminal. A técnica mais utilizada na UNESP para remoção de plasma seminal era a centrifugação 600 x G durante 10 minutos, que apresentava maior taxa de recuperação espermática com maior porcentagem de espermatozoides íntegros, em conformidade com Dell'aqua et. al. (2001). Em seguida, o sêmen era submetido a análises macro e microscópicas, que incluíam volume, cor, motilidade e vigor espermático, classificada como exames imediatos, além dos exames mediatos: concentração espermática e preparo de material para análise de patologia espermática (PAPA et.al., 2014).

Segundo Papa et.al., 2014, os parâmetros e técnicas a serem utilizados nos exames imediatos e mediatos são:

- Volume (V) = Podendo variar de 20 a 100 ml.
- Cor = Desde branco acinzentado até um branco leitoso.
- Densidade (ρ) = Varia do tipo aquoso até leitoso e está diretamente relacionado com a concentração espermática.
- Odor = “Sui-generis”.
- Motilidade espermática (ME) = Se faz uma pequena gota de sêmen entre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C e realiza-se a visualização em microscópio com aumento de 200 vezes. A motilidade espermática é analisada segundo uma escala de porcentagem variando de 0 a 100% (Motilidade Total (MT), porcentagem de células móveis). Caso a amostra esteja muito concentrada deve-se realizar uma diluição em meio diluidor, esta diluição pode ser 1:1 (motilidade ideal $\geq 70\%$).
- Vigor espermático = Concomitantemente com a motilidade espermática se avalia o vigor espermático na escala de 0 a 5 (velocidade com que o espermatozoide se desloca, quanto maior a velocidade maior o valor), o vigor ideal é ≥ 3 .
- Concentração espermática ([\square]) = Retira-se do volume ejaculado uma alíquota de 20 μ l utilizando-se uma pipeta de Sahli ou micropipeta e coloca-se em um tubo de ensaio contendo 1 ml de água destilada aquecida ou 1 gota de sêmen em 19 gotas de água destilada. Após boa homogeneização, monta-se uma Câmara de Neubauer (Figura 6), preenchendo seus dois retículos, conta-se todos os espermatozoides presentes em 5 quadrados de cada retículo, sendo que a variação entre cada um dos lados da câmara

¹ BotuIA®

(retículos) não pode ser maior que 10% (se for maior repete-se a operação). Após a operação calcula-se a média aritmética, o valor é referente a [] por ml.

- Preparo de material para análise de patologia espermática = Coloca-se uma gota de sêmen em uma lâmina e realiza-se um esfregão, fixa-se o esfregão em metanol e cora-se a lâmina com corantes, ex: Karras modificado por Papa et. al. (1998) (2 minutos no Rosa Bengala, lava-se a lâmina em água corrente fraca, então se põe 1 min no Tanino, lava-se novamente e 30 segundos no Azul Vitória, lava-se a lâmina, deixa secar, observa-se em microscopia de luz (óptica) aumento de 1000x). Conta-se 200 células, percorrendo a lâmina de forma homogênea e classificando os espermatozoides conforme suas patologias, obtendo no final as porcentagens de espermatozoides normais e de cada patologia.

Figura 5 - BotuIA® com sêmen diluído.



Fonte: Autora (2018).

Figura 6 - Câmara de Neubauer.



Fonte: Autora (2018).

As verificações de motilidade espermática nos dois locais eram realizadas de formas diferentes, sendo na Equicenter de maneira manual entre lâmina e lamínula e na UNESP através da análise computadorizada do movimento espermático (CASA) automaticamente. O sistema CASA demonstra por meio da visualização e digitalização de imagens sucessivas dos espermatozoides, processando, analisando e fornecendo informações acuradas, precisas e significativas da cinética individual das células, e também valores estatísticos médios sumarizados da população global (AMANN e KATZ, 2004). No entanto, segundo Arruda et. al., 2011, a técnica manual é a mais utilizada na rotina laboratorial e continua tendo grande valor, principalmente para diferenciar sêmen de baixa e alta qualidade.

Os parâmetros de motilidade espermática gerados pelo CASA e utilizados na UNESP são: Motilidade total, motilidade progressiva, espermatozoides rápidos, velocidade de trajeto, velocidade progressiva e velocidade curvilinear. A motilidade total (MT, %), referente à população de células que estão se movendo com uma velocidade mínima determinada no setup, sendo a proporção de células móveis do total; Motilidade progressiva (MP, %), refere à porcentagem de células movendo-se progressivamente; Espermatozoides rápidos (RAP); Velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula; Velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto; Velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), que é a velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula (ARRUDA, 2000).

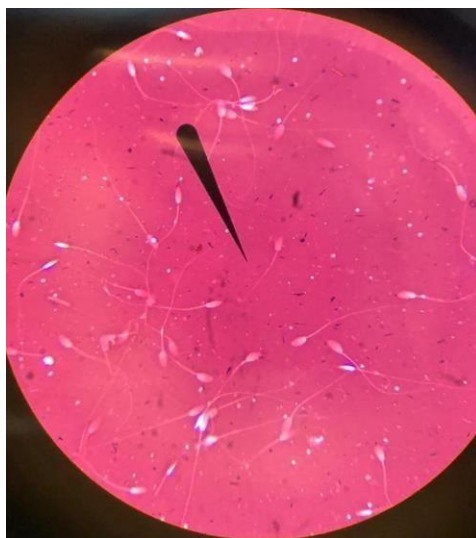
As análises morfológicas dos espermatozóides eram realizadas de por meio de técnicas manuais de coloração (eosina-nigrosina - Figura 7 e Karras modificado – Figura 8) ou

automatizadas não coradas (microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC - Figura 9). Devido ao valor agregado, somente na UNESP fazia-se uso do DIC, por possuir o equipamento. Contrariando as recomendações da literatura, na Equicenter não se fazia rotineiramente as análises morfológicas, somente de animais desconhecidos pela central em que tinham seu sêmen trazido para realização de IA em éguas doadoras.

A prova laboratorial de caráter manual de coloração utilizando eosina-nigrosina trata-se de um teste muito prático e acessível, podendo ser utilizado à campo no intuito de avaliar a integridade da membrana espermática (IM) (KUMI-DIAKA; BADTRAM, 1994). A técnica era realizada a partir de um esfregaço seminal em que são utilizados dois corantes, a eosina e a nigrosina. A eosina é um corante que não é capaz de penetrar em células com membrana intacta, porém em células lesadas, as mesmas ficam coradas na cor rosa. A nigrosina vai atuar promovendo um contraste mais escuro de fundo da lâmina, permitindo a visualização dos espermatozoides que não foram corados (MACÊDO, 2017). Este teste é recomendado por ser uma avaliação adicional e vem sendo bem utilizado (BRITO, 2007).

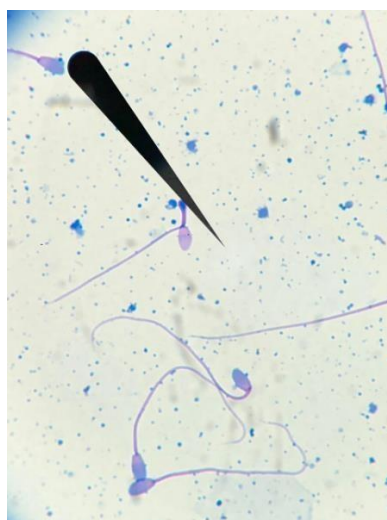
Segundo Raphael (2007), a membrana plasmática é responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico celular, atuando como uma barreira entre os meios intra e extracelulares. Danos ocasionados nesta estrutura podem levar a perda de homeostase com posterior morte da célula (AMANN; PICKET, 1978; AMANN; GRAHAN, 1993).

Figura 7 - Teste de eosina-nigrosina.



Fonte: Autora (2018).

Figura 8 - Teste Karras modificado.



Fonte: Autora (2018).

Figura 9 - Análise morfológica utilizando o sistema automatizado DIC.



Fonte: Autora (2018).

A classificação morfológica adotada por ambos os locais de estágio era de espermatozoides normais e anormais. Sendo as anormalidades baseada em Blom (1973), que separa em defeitos maiores (DMa - alterações de acrossomo, presença de gota citoplasmática proximal, patologias de cabeça, alterações de peça intermediária, patologias de cauda e formas teratológicas) e defeitos menores (DMe - patologias da cabeça, alterações de inserção entre peça intermediária e cabeça, cauda dobrada ou enrolada e gota citoplasmática distal).

Outra técnica empregada para avaliação seminal era a porcentagem de leucócitos, realizada a partir de um esfregaço de uma gota de sêmen, corado com kit de corantes hematológicos (Panótico Rápido) e analisado em microscopia óptica através da contagem de cem células entre leucócitos e espermatozoides, gerando uma porcentagem. Na contagem era

dado maior enfoque para os neutrófilos (N) e bactérias presentes na amostra. Esta avaliação foi igualmente descrita por Silva et. al. (2014). Adotava-se essa contagem quando havia alguma alteração física ou química do sêmen coletado, pois a presença de leucócitos no sêmen de garanhões é considerada uma condição incomum e indica um processo infeccioso no trato genital (VOSS; MCKINNON, 1993). Além disso, a contaminação do sêmen com neutrófilos pode ser utilizada para prever fertilidade (GUNN; BROOKS, 2011), já que até mesmo em baixas quantidades os leucócitos podem interferir na função espermática (BAUMBER et al., 2002).

Na rotina das duas instituições foram realizadas ao total 56 coletas de sêmen por vagina artificial em 9 garanhões. Destas, 36 foram de 3 animais da raça BH, identificados como BH1, BH2 e BH3, entre 2 e 3 anos que estavam iniciando o condicionamento para monta em manequim e coleta por meio de vagina artificial e somente 9 ejaculados foram submetidos a análise seminal completa. O espermograma completo também foi realizado uma única vez em seis colheitas realizadas em um animal adulto, da raça puro sangue inglês (PSI), PSI1. Outras três ocorreram de um único animal, adulto, quarto de milha (QM), de maneira consecutiva para análise em diferentes diluentes, nomeado QM1. As últimas 11 coletas foram realizadas em outros 4 garanhões adultos, um BH, dois QM e um mangalarga marchador (MM), em plena atividade reprodutiva, porém as análises não incluíram morfologia espermática, identificados respectivamente de BH4, QM2, QM3 e MM1.

Tabela 3 - Espermogramas provenientes de 3 coletas com vagina artificial do animal identificado como BH3.

ANÁLISE 1						
V	Cor	ρ	Odor	MT	MP	RAP
10 ml	Amarelo leitoso	Leitoso	“Sui generis”	84%	32%	142
VAP	VSL	VCL	Vigor	\square	IM	N
104 $\mu\text{m/s}$	258 $\mu\text{m/s}$	73 $\mu\text{m/s}$	4	302 x $10^6/\text{ml}$	-	5%
ANÁLISE 2						
V	Cor	ρ	Odor	MT	MP	RAP
10 ml	Amarelo leitoso	Leitoso	“Sui generis”	89%	40%	143
VAP	VSL	VCL	Vigor	\square	IM	N
107 $\mu\text{m/s}$	258 $\mu\text{m/s}$	73 $\mu\text{m/s}$	4	378 x $10^6/\text{ml}$	-	12%

ANÁLISE 3						
V	Cor	ρ	Odor	MT	MP	RAP
8 ml	Amarelo leitoso	Leitoso	“Sui generis”	85%	37%	132
VAP	VSL	VCL	Vigor	[]	IM	N
97 μm/s	236 μm/s	76 μm/s	4	356 x 10 ⁶ /ml	70% lesados	-

Os dados obtidos na Tabela 3 nos sugerem que o animal possui vesiculite seminal, concordando parcialmente com a literatura que caracteriza essa patologia em garanhões pela presença de bactérias e neutrófilos na última fração do ejaculado, em razão de não terem sido visualizadas bactérias no material, comprometendo diretamente a viabilidade espermática (OLIVEIRA, 2018). Outro fator que nos leva a suspeitar de vesiculite, é a coloração do sêmen amarelo leitoso nos remetendo a material purulento, que no qual condiz com a descrição de Tibary et. al. (2009).

Os parâmetros morfológicos da Tabela 3 não foram mencionados por ser parte de experimento de mestrado. Assim como o tratamento estabelecido para o animal e os resultados de cultura microbiológica de sêmen e endoscopia anteriormente realizadas, que nos leva a um diagnóstico confirmatório.

Tabela 4 - Espermiograma de garanhão da raça quarto de milha (QM) adulto.

EJACULADO 1						
V	Cor	P	Odor	MT	MP	RAP
30 ml	Branco leitoso	Leitoso	“Sui generis”	2%	0	1
[]	IM	N	Células	Bactérias	Dma	DMe
105 x 10 ⁶ /ml	52% lesados	Ausente	Da linhagem espermatogênica	Presença moderada	36%	10%
EJACULADO 2						
V	Cor	ρ	Odor	MT	MP	RAP
35 ml	Branco leitoso	Leitoso	“Sui generis”	5%	2%	1

[]	IM	N	Células	Bactérias	Dma	DMe
117 x 10 ⁶ /ml	55% lesados	Ausente	Da linhagem espermatogênica	Presença moderada	38%	12%
EJACULADO 3						
V	Cor	P	Odor	MT	MP	RAP
30 ml	Branco leitoso	Leitoso	“Sui generis”	7%	3%	5
[]	IM	N	Células	Bactérias	Dma	DMe
18 x 10 ⁶ /ml	92% lesados	Ausente	Da linhagem espermatogênica	Presença moderada	24%	7%

Tabela 5 - Testes com diferentes diluentes nos ejaculados citados na Tabela 4.

EJACULADO 1		
BotuSpecial®	BotuGold®	NZ®
MT: 0	MT: 0	MT: 0
MP: 0	MP: 0	MP: 0
RAP: 0	RAP: 0	RAP: 0
EJACULADO 2		
BotuSpecial®	BotuGold®	NZ®
MT: 5%	MT: 5%	MT: 2
MP: 2%	MP: 2%	MP: 0
RAP: 2%	RAP: 3%	RAP: 1
EJACULADO 3		
BotuSpecial®	BotuGold®	NZ®
MT: 14%	MT: 7%	MT: 12
MP: 4%	MP: 0	MP: 6
RAP: 11%	RAP: 0	RAP: 6

As anormalidades morfológicas citadas na Tabela 4 do primeiro ejaculado foram 5% defeitos de acrossomo, 1% de cabeça estreita na base, 1% cabeça pequena anormal, 21% de gota citoplasmática proximal, 4% de defeitos em peça intermediária, 3% de cauda fortemente dobrada ou enrolada e 1% de cauda dobrada com gota, totalizando 36% de defeitos maiores.

Os 10% de defeitos menores eram 1% de implantação de cauda retroaxial, 5% de cauda dobrada ou enrolada e 4% de gota citoplasmática distal. O segundo ejaculado apresentou 38% de defeitos maiores, sendo 2% de defeitos de acrossomo, 1% de cabeça isolada patológica, 3% de cabeça pequena anormal, 1% de “Pouchformation”, 1% de cabeça “Knobbed”, 20% de gota citoplasmática proximal, 3% de edema de peça intermediária, 3% de pseudogota e 4% de gota fortemente dobrada ou enrolada. Nos defeitos menores foram 1% de cabeça delgada, 4% de cabeça isolada normal, 2% de cauda dobrada ou enrolada e 5% de gota citoplasmática distal. No terceiro ejaculado foram detectados 24% de defeitos maiores, sendo 2% de defeitos de acrossomo, 1% de cabeça estreita na base, 3% de cabeça pequena anormal, 1% de “Pouchformation”, 9% de gota citoplasmática proximal, 1% de desfibrilação, 1% de fratura, 5% de cauda fortemente dobrada ou enrolada e 1% de formas duplas. Os defeitos menores totalizaram 7%, sendo 5% de cauda dobrada ou enrolada e 2% de gota citoplasmática distal. Baseado nos resultados apresentados nas Tabelas 4 e 5, podemos concluir que o animal possuía hipocinesia espermática, que é referente a baixa motilidade.

O tratamento recomendado para este caso foi aplicação de 2 ml intramuscular (IM) de Acetato de Gonadorelina (Lecirelina) uma vez ao dia até novas recomendações, suplementação com produto contendo L-Carnitina, Selênio e Zinco (BotuMix Garanhão Plus®) acrescido de 200 g de **pentoxifilina** para cada litro de BotuMix Garanhão Plus®. A frequência de coleta deverá ser mantida três vezes na semana em dias alternados. E retorno do animal em 30 dias. O resultado frente ao tratamento não foi acompanhado.

A orientação para o uso de Lecirelina, um análogo ao hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), transcorreu devido a ação desse hormônio na hipófise anterior, regulando a produção e liberação dos hormônios gonadotróficos, o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), que irão atuar nas células dos testículos regularizando a espermatogênese e a esteroidogênese (BERTOL, 2009).

A suplementação alimentar com BotuMix Garanhão Plus®, se deu principalmente devido a presença de L-Carnitina na sua fórmula, considerando que esta substância disponibiliza ácidos graxos de cadeia longa como fonte energética em quase todos os tipos celulares, permitindo assim, uma maior viabilidade espermática bem como uma maior produção no número de espermatozoides pela sua ação, também disponibilizando maior fonte energética no processo de divisão celular por que passam as espermátides durante a espermatogênese (BAUMGARTNER; BLUM, 1997). Ainda segundo Baumgartner e Blum (1997), outro importante papel desempenhado pela L-carnitina, seria sua capacidade de proteção e modulação

da membrana espermática através da provisão de ácidos graxos para sua síntese, proteção da membrana lipídica contra a peroxidação, modulação das propriedades da membrana (ex.: elasticidade) entre outros.

Calogero et. al., 1998, descrevem que pentoxifilina tem como efeito a melhora nas características cinéticas e o número de espermatozoides exibindo motilidade hiperativada, qualificando a escolha pelo medicamento. Outra técnica utilizada para a coleta de sêmen foi realizada a partir da cauda do epidídimo de um animal que veio a óbito. Os testículos chegaram em caixas térmicas embalados separadamente em luvas de palpação contendo soro fisiológico, porém somente um deles apresentava a cauda do epidídimo. O órgão com a estrutura faltante foi descartado. As estruturas apresentavam odor característico de anti-inflamatório não esteroideal, flunexin meglumine, e apresentavam tamanho reduzido para um garanhão adulto. O histórico clínico do animal apresentava somente diagnóstico prévio de laminite, que de acordo com Alvarenga e Papa (2009) tem relação com a degeneração testicular devido ao estresse doloroso gerado e consequentemente aumento de cortisol sérico. A possível claudicação gerada pela laminite pode provocar uma redução na frequência de expressão do comportamento sexual (SILVA et. al., 2013). E essa expressão, deve-se à limitação física, originada pelo próprio fator estressante (WALKER et al., 2010). Isso altera a liberação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), alterando o efeito estimulatório na secreção de esteroides sexuais e modificando a fisiologia testicular (RAZDAN et. al., 2001).

Para a coleta dos espermatozoides o método utilizado foi o por fluxo retrógrado descrito por Garde et. al. (1994). O procedimento foi iniciado com a lavagem do testículo com soro fisiológico para retirada de sangue presente, seguida da separação do testículo da cauda do epidídimo pinçando uma das extremidades para que não houvesse perda seminal. Consequentemente foram retiradas as túnicas que recobriam o epidídimo e desfeito cuidadosamente os contornos que formam a cauda, com auxílio de tesoura e pinça hemostática. A lavagem foi realizada com o diluente BotuSêmen® previamente aquecido no banho-maria a 37 °C, utilizando 20 ml do produto injetados no lúmen do epidídimo que estava verticalmente estendido sobre um Becker.

Imediatamente após a coleta foi realizada concentração e motilidade espermática. O sêmen então foi centrifugado a 600 x G durante 10 minutos, descartado sobrenadante e diluído em BotuCrio® apenas o “pellet” de espermatozoides, com concentração espermática corrigida para 200 x 10⁶/ml. Em seguida o sêmen foi introduzido em palhetas de 0,5 ml identificadas e fechadas com álcool polivinílico. O resfriamento ocorreu lentamente até 4 °C, a taxas iguais ou inferiores a 0,05 °C/min para evitar/diminuir a ocorrência de choque pelo frio (Pickett; Amann,

1993). Após atingir 4 °C, as palhetas foram posicionadas horizontalmente numa raque a aproximadamente 3 cm acima do nível de nitrogênio líquido com temperatura média da curva de congelamento -70 °C/min, a mais utilizada segundo (Martin, et. al., 1979). Posteriormente foram imersas em nitrogênio líquido para armazenamento. O descongelamento de uma das palhetas para análise foi efetuado 24 h após o congelamento e o único parâmetro avaliado foi a motilidade total que resultou em 10%.

3.1.3 Controle folicular e intervenções no ciclo estral

Os controles foliculares das éguas eram realizados de forma semelhante nas duas instituições, porém, na UNESP a palpação era iniciada com retirada das fezes, localização anatômica dos ovários e em seguida utilizava-se o ultrassom para verificação de edema e possível líquido uterino, além da verificação de possíveis estruturas presentes nos ovários. Na Equicenter, a palpação retal levava em conta outros parâmetros além dos avaliados na UNESP, como o tônus uterino e cervical.

O tônus uterino era classificado de 1 a 3, sendo 1 tônus mínimo referente ao anestro e início da atividade cíclica, com consistência flácida e formato não bem definido; o 2, era relacionado ao diestro em que o útero tinha consistência e contratilidade evidentes ao toque e formato tubular; no tônus uterino classificado como 3, a consistência era macia, a contratilidade não perceptível ao toque e o formato era tubular, referente ao estro.

A classificação cervical era feita de acordo com sua abertura, de 0 a 2. A cérvix 0 era completamente fechada, resultante da ação de progesterona no diestro e na gestação (Hughes et al., 1977), além de ter consistência firme, com formato tubular. A cérvix considerada 2 era completamente aberta, relacionada ao estro, flácida e não tendo formato bem definido ao toque. As classificações entre essas duas citadas eram os intermediários, quanto mais próximo ao zero mais firme e fechada, quanto mais próximo a dois, mais flácida e aberta. Os números da classificação eram inversamente proporcionais a tonicidade cervical.

O edema uterino era dividido em sem edema ou 0, 1, 2 e 3, em que o 3 visualizava-se na tela do ultrassom as pregas endometriais alargadas (Figura 10), semelhantes a uma laranja cortada, predizendo o período do estro, onde esse edema desaparece 24 horas antes da ovulação (ALLEN, 1994; MCKINOON e VOSS 1993). E no caso sem edema ou 0 as dobras endometriais estão quase imperceptíveis, referente ao diestro pela ação da progesterona (OLIVEIRA, 2015). Com relação ao líquido no útero era verificada ausência ou presença no lúmen uterino.

Figura 10 - Imagem ultrassonográfica de um útero com pregas endometriais alargadas, referente a edema 3 e presença de pequena quantidade de líquido no lúmen



Fonte: Arquivo pessoal.

O monitoramento estral foi realizado em 116 animais, sendo 13 na UNESP e 103 na Equicenter, resultando em 391 palpções e ultrassonografias transretais. A hormonioterapia era utilizada nos dois locais, porém na UNESP, não se empregava este recurso para encurtamento do anestro estacional, apenas para indução da ovulação e para manter as éguas com sinais do período estrogênico para auxiliar na coleta de sêmen dos garanhões.

Na Equicenter, a indução de estro em éguas em período de anestro profundo era realizada a partir da aplicação de 2,0 ml de 17 β - estradiol (IM), concordando com Neely (1983) que demonstra a capacidade de induzir sinais de estro com a administração de uma pequena dose de estradiol em éguas durante anestro profundo. O mesmo estradiol era utilizado na UNESP também em doses de 2 ml para manter as éguas com sinais de cio e otimizar a coleta de sêmen, se optassem por manter mais alguns dias os sinais a aplicação era repetida no terceiro dia após a última aplicação.

Em casos de corpo lúteo (CL) persistente ou após lavagem uterina para retirada de embrião, era aplicado 1 ml dinoprost trometamina², análogo natural da prostaglandina (PGF2 α), para finalizar esta fase luteal (MCKINNON, VOSS, 1992).

A aplicação de progesterona (P₄) tinha como função a indução de ciclo artificial em receptoras de embriões (FARIA; GRADELA, 2010; CAIADO et al., 2007), sincronização do estro e da ovulação em éguas cíclicas para facilitar a implantação de programas de inseminação artificial e transferência de embriões (COSTA, 2003) e manutenção de gestação, iniciando a terapia no primeiro diagnóstico de gestação e mantida até os 120 dias (MCKINNON; VOSS, 1992). Para a finalidade de manutenção da gestação era sempre utilizada a P₄ longa ação para

² Lutalyse® - laboratorio cidade estado

diminuir o estresse e trabalho devido as aplicações diárias das formas de curta ação (PESSOA et al., 2004).

Visando uma ovulação mais precoce e próxima ao tempo desejado, era utilizado o Sincrorrelin®, que tem como princípio ativo a deslorelina, um análogo do GnRH, que induz a ovulação de 36 a 48 h (HEMBERG et al., 2006), por provocar o aumento nas concentrações de LH (MCKINNON et al., 1993; MUMFORD et al., 1995). Em apenas um caso, foi utilizado gonadotrofina coriônica humana (hCG) com o mesmo intuito que a desorelina.

Quando havia presença de líquido uterino, era injetado 2 ml (20 UI) de ocitocina, apesar de Malschitzky et. al. (2007) descreverem que estudos indicam um melhor efeito na evacuação mecânica do útero com doses entre 2,5 a 5 UI. Caso a cérvix estivesse aberta, era realizada massagem no sentido craniocaudal para auxiliar na eliminação deste líquido.

Todos os controles foliculares e intervenções estrais por meio da hormonioterapia foram desenvolvidos para uso da biotécnica reprodutiva de transferência de embrião em éguas doadoras e receptoras.

3.1.4 Inseminação artificial

As inseminações artificiais realizadas no período de estágio curricular totalizaram 19 procedimentos, sendo 15 com sêmen fresco ou refrigerado e quatro que foram efetuadas com sêmen congelado. O sêmen fresco foi coletado em todos os animais com vagina artificial de acordo com a técnica descrita anteriormente. Os refrigerados foram trazidos de outros haras ou centrais acondicionados em caixas térmicas de refrigeração para sêmen. Todos foram previamente avaliados.

As IAs com sêmen refrigerado e fresco utilizavam uma única dose com 1 bilhão e 500 milhões de espermatozoides/ml, respectivamente e, a deposição era realizada no corpo uterino por meio de pipeta de IA descartável. Nas inseminações com sêmen congelado era utilizado o número de palhetas conforme a concentração espermática contida em cada palheta e o histórico da partida de sêmen do garanhão, a dose utilizada era próximo a 200×10^6 de espermatozoides. O descongelamento das palhetas era feito em banho-maria a 37 °C por 30 segundos. A deposição era realizada intracornual profunda, ipsilateral a ovulação (SAMPER et. al., 2007), acopladas em um aplicador de aço inoxidável e uma bainha flexível para IA. O período de IA com sêmen congelado era logo após a ovulação e com sêmen fresco e/ou refrigerado era no momento da indução ou após 24 horas da aplicação do indutor, devido a viabilidade média dos espermatozoides no trato reprodutor da fêmea serem de 8-12 horas e 48 horas, respectivamente.

Anteriormente as IAs, as éguas eram posicionadas no tronco de contenção, o reto era esvaziado e realizada limpeza do períneo, vulva e clitóris com detergente neutro e água corrente, finalizando com ringer lactato. Para facilitar a entrada da mão com os equipamentos pela vulva, era inserido uma pequena quantidade de **lubrificante íntimo (KY®)** na luva de palpação. Todas as éguas que foram submetidas a IA passaram por um controle folicular conforme descrito anteriormente e se necessário fizeram uso de hormônios para manipulação do ciclo. Essas IAs eram realizadas para que posteriormente fosse realizada a coleta e transferência dos embriões.

3.1.5 Diagnóstico de gestação

Os diagnósticos de gestação (DGs) eram realizados por ultrassonografia transretal entre os dias 4 e 6 pós-inovulação na égua receptora. Nessa fase da gestação a vesícula embrionária se apresenta em posição centralizada no lúmen uterino quando utilizada a ultrassonografia (MOURA; MERKT, 1996) e há intensa movimentação embrionária, denominada migração transuterina, sendo que esta pode ocorrer de 10 a 13 vezes por dia neste período (GINTHER, 1992), facilitando a diferenciação de cistos uterinos. Foram realizados 24 DGs, com 21 resultados positivos, equivalentes a 87,5% de sucesso.

3.1.6 Sexagem fetal

Foram realizadas quatro ultrassonografias transretais com a intenção de sexar os fetos. As gestações estavam entre 120 e 130 dias, contendo no intervalo ideal dos autores Renaudin et. al. (1997) e Renaudin (2001), que compreende entre 110 e 150 dias de gestação, pois após esse período o exame torna-se mais difícil em função da localização mais cranial do útero.

A determinação do sexo dos fetos foi realizada através das gônadas fetais e resultaram em dois machos, uma fêmea e um que não foi determinado devido a posição fetal no momento. Nos machos (Figura 11), a gônada possuía uma aparência homogênea, com uma linha fina central e longitudinal ecogênica (representa o mediastino), pouco visível após os 125 dias de gestação. Nas fêmeas (Figura 12), a gônada contém no seu interior a presença de uma estrutura ecogênica circular que é circundada por um halo hipoeecogênico central (representando a região cortical e a medular). Seu tamanho e localização são similares às gônadas do macho. Quando em identificação frontal, as gônadas situam-se nas partes caudal e ventral do abdômen, entre os membros pélvicos. A definição de acordo com cada sexo foi fundamentada em Renaudin et al. (1997).

Figura 11 - Imagem ultrassonográfica de gônada masculina homogênea e apresentando linha do mediastino de um feto equino, identificada pela seta.



Fonte: Autora (2018).

Figura 12 - Imagem ultrassonográfica de gônada feminina com estrutura ecogênica circular circundada por um halo hipoecogênico central de um feto equino, identificada pela seta.



Fonte: Autora (2018).

3.2 REPRODUÇÃO EM PEQUENOS ANIMAIS

Os atendimentos de pequenos animais foram todos realizados na UNESP.

3.2.1 Coleta de sêmen e espermograma

Durante o período de estágio curricular foram realizadas duas coletas seminais em cães por manipulação digital, que consiste em massagear o bulbo da glândula de forma a estimular a

ejaculação, de acordo com os autores Johnston et. al. (2001) é a técnica mais utilizada. Em uma das coletas, foi utilizada uma fêmea em estro e na outra um swab com secreção vaginal de uma fêmea. Feldman e Nelson (1996), descreveram que em algumas vezes faz-se necessário o uso dessas técnicas para que o macho possa cheirar e assim excitar-se. Os equipamentos utilizados para as coletas foram tubos de ensaios conectados a um funil plástico (JOHNSTON et al., 2001).

Johnston et. al. (2001) destacam que o sêmen canino possui três frações, sendo a primeira e a terceira compostas principalmente por secreções da próstata, e a segunda pela fração espermática, originada das caudas dos epidídimos. A primeira fração foi descartada.

As coletas foram realizadas para inseminação artificial com sêmen fresco e para avaliação seminal de um achado de aumento prostático, compressão uretral e suspeita de hiperplasia prostática benigna (HPB). Na coleta destinada a inseminação foi realizada avaliação subjetiva pelo método lâmina-lamínula da motilidade progressiva (80%) e do vigor (3-4), e a coloração seminal apresentava-se mais próxima de translúcido, considerada normal por Johnston et. al. (2001). Na avaliação do sêmen do animal que apresentava aumento prostático, a coloração estava rósea (hemospermia) e o líquido estava azoospermico. A hemospermia corrobora com as descrições de Badawy et.al. (2012) e Zelli et. al. (2013), em que as características sintomáticas de HPB quando o aumento do volume glandular promove a compressão de segmentos dos tratos urinário e/ou intestinal, são constipação, tenesmo, alteração no diâmetro das fezes, polaquiúria, disúria, hematúria e hemospermia. A azoospermia consente com dados encontrados por Kawakam et. al. (2001) em cães com HPB.

3.2.2 Avaliação do período estral

As avaliações de ciclo estral com intuito de inseminação artificial foram realizadas em duas cadelas por citologia vaginal e vaginoscopia. A literatura nos orienta a realizar além da citologia e vaginoscopia, a análise comportamental e dosagem de hormônios sexuais de forma prospectiva durante todo o ciclo estral da cadela (DAVIDSON, 2006), porém, devido ao custo, nenhum proprietário optou pela dosagem.

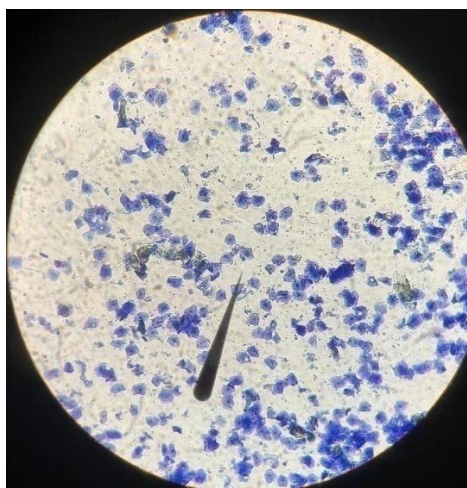
A citologia vaginal foi realizada com auxílio de escova cervical ou swab e por rolagem foi depositado o material em toda a extensão de uma lâmina, sendo repetido em 3 lâminas o processo. Esperou-se a lâmina secar e então foi corada com Panótico rápido.

Em um dos casos o proprietário relatou aceitação da monta e aumento vulvar. Na citologia vaginal foram encontradas células superficiais queratinizadas, além de intermediárias grandes (Figura 12). A vaginoscopia nos demonstrou pregas vaginais primárias, róseo pálido, úmidas e com secreção sanguinolenta. Com base na literatura classificamos esta

cadela em final de proestro e início de estro, em que relata a caracterização do proestro por aumento progressivo do tamanho da vulva e turgor, secreção vaginal de feromônios que atraem os machos. O perfil do epitélio vaginal alterando-se progressivamente por pequenas células intermediárias, grandes intermediárias e células queratinizadas (SILVA, 2016). Na vaginoscopia, o aspecto da mucosa vai se modificando do róseo para o pálido e as pregas vaginais vão ficando gradativamente mais pronunciadas (JEFFCOATE; LINDSAY, 1989). No estro, há um comportamento de aceitação da monta e submissão ao macho (CONCANNON, 1986; VANNUCHI et. al., 1997).

No outro caso foi realizada citologia vaginal e evidenciaram células parabasais e neutrófilos, condizendo com descrito por Silva (2016) como anestro em cadelas. Após esse resultado não foi realizada vaginoscopia.

Figura 13 - Citologia vaginal de cadela demonstrando células superficiais queratinizadas e intermediárias grandes (final do proestro e início do estro).



Fonte: Autora (2018).

3.2.3 Inseminação artificial

Com o diagnóstico obtido no primeiro caso descrito no item 3.2.1, foi realizada inseminação artificial intravaginal utilizando uma sonda rígida e depositado o sêmen fresco ao longo da vagina da cadela (LEÃO, 2003), em seguida foram elevados os membros posteriores por 15 minutos visando prevenir o refluxo de sêmen (SILVA et al., 2001). Foi recomendado que a cadela fosse inseminada pelo menos mais uma vez no terceiro dia pós primeira inseminação, porém o proprietário não retornou.

3.2.4 Diagnóstico de gestação

Um dos diagnósticos gestacionais realizados foi em uma cadela SRD, por exame ultrassonográfico em que foi visualizado pelo menos duas vesículas embrionárias arredondadas. Estas vesículas são visibilizadas após o 20º dia do pico de LH, com fluido anecóico em seu interior (CONCANNON et. al.; MEDEIROS et. al., 2004).

Diferentemente da cadela, em uma gata foi diagnosticada prenhez positiva, porém os fetos já apresentavam divisão das câmaras cardíacas, que de acordo com Zambelli et al. (2002) estavam entre 48 e 50 dias de gestação.

3.2.5 Acompanhamento gestacional

Oito acompanhamentos gestacionais foram efetuados em cadelas e visavam observar a viabilidade fetal, a quantidade de fetos e como forma de um método profilático contra complicações do parto. O primeiro exame realizado no acompanhamento gestacional, era a ultrassonografia, em que era possível visualizar a atividade cardíaca e movimento fetal que são achados confirmatórios para a viabilidade fetal (MEDEIROS et. al., 2004). A frequência cardíaca fetal era aferida no modo B do ultrassom e tinham como base Jaretta (2004), que descreve a frequência cardíaca fetal com 230 batimentos por minuto (bpm), com cerca de 214 bpm no início, e de 238 bpm por volta do 40º dia de gestação, havendo uma redução desses valores quando o parto está próximo.

Após avaliação cardíaca, era mensurado o diâmetro biparietal (DB) dos fetos para estimativa da idade gestacional (IG), por meio da fórmula $IG = (15 \times DB) + 20$, para gestações com mais de 40 dias (NYLAND; MATTOON, 2002). Quando a estimativa gestacional era superior a 45 dias de IG, era solicitado exame radiográfico, pois os fatos já são radiopacos (ALLEN, 1995), para análise de quantos fetos e pelvimetria da mãe.

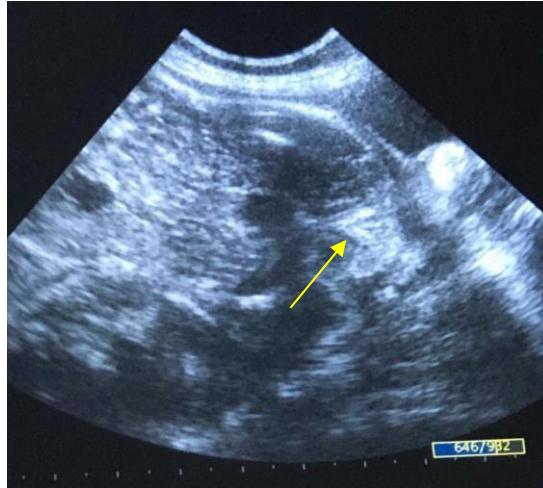
De acordo com FERREIRA (1991), a pelvimetria consiste basicamente na determinação métrica das dimensões pélvicas e sua utilização está diretamente relacionada à reprodução, fundamentando um método profilático contra as complicações do parto causadas por deformação, má-formação ou sequelas de afecções presentes nessa estrutura óssea.

3.2.6 Sexagem fetal

Durante o acompanhamento gestacional citado acima, o feto estava posicionado longitudinalmente, proporcionando a visualização de duas linhas hiperecóicas que se uniam anteriormente adquirindo formato piriforme e outra linha hiperecóica central dividindo a região central hipoeecóica ao meio (representando as pregas labiais vulvares), o sexo foi determinado

como feminino (Figura 14). Esses resultados são semelhantes aos descritos nos fetos humanos (SCHOLLY et al., 1980).

Figura 14 - Imagem ultrassonográfica de genitália feminina em feto canino, identificada pela seta.



Fonte: Autora (2018).

3.2.7 Exame clínico do neonato

Foram realizados 15 exames físicos em neonatos durante 04 transcirúrgicos de cesariana. Sendo 08 caninos e 07 felinos, dentre os caninos, 02 animais eram natimortos.

As abordagens emergenciais dos recém-nascidos incluíam os cuidados referentes à reversão dos quadros de hipotermia, hipoglicemia e hipovolemia, aumentando dessa forma a sobrevida desses pacientes (MACINTIRE et al, 2005). Inicialmente, eram realizados os processos de ressuscitação, que compreende a remoção da placenta ao redor da cabeça, especialmente aquelas que comprometem a abertura das narinas (HOSKINS, 2008), a desobstrução das vias aéreas com auxílio de pera pediátrica e estimulação do tórax esfregando gentilmente com uma toalha macia aplicando pressão positiva (Figura 15) e oxigenioterapia (Figura 16) através de máscaras adaptadas acopladas para promover a ventilação (DAVIDSON, 2003). Além da transfixação e corte do cordão umbilical.

Figura 15 - Desobstrução das vias aéreas e massagem para pressão positiva em neonato canino.



Fonte: Autora (2018).

Figura 16 - Oxigenioterapia em máscaras adaptadas em neonatos felinos.



Fonte: Autora (2018).

O aquecimento desses neonatos era realizado com auxílio de secadores de cabelo para além de aquecer, secá-los, mantendo-os sempre a uma temperatura ambiente mais alta que a necessária para animais adultos (JOHNSTON et al., 2001). Caso ainda fosse necessário, o aquecimento era auxiliado com uso de luvas de procedimentos preenchidas com água morna colocadas embaixo desses animais (Figura 17).

Figura 17 - Aquecimento de neonato canino com luva de procedimento preenchida com água morna.



Fonte: Autora (2018).

A avaliação da frequência cardíaca era feita através da auscultação. Já a temperatura corporal e peso eram registrados utilizando um termômetro retal e uma balança de precisão (CHAVES, 2011). Outras características eram consideradas, como a abertura dos olhos, dos ouvidos e a existência dos sentidos (PEIXOTO; BEZERRA JUNIOR, 2010), a morfologia da cabeça e vias aéreas e orais, a fim de verificar quanto à malformação do crânio, lábio leporino, narinas estenóticas ou fenda palatina (CHAVES, 2011). Em seguida, eram observados a região perianal e genital para detectar possíveis anomalias congênitas como ânus imperfurado e fístulas, seguidamente da realização de uma massagem suave com um algodão molhado sobre a área genital para provocar a micção (CHAVES, 2011) e defecação, eliminando assim o mecônio caso o animal não tivesse o feito.

Enquanto ainda transcorria a cesariana ou a mãe ainda estivesse em recuperação anestésica, os animais eram alimentados com Pet Milk®, suplemento substituto do leite materno animal vendido comercialmente, diluído em água (Figura 18) através de mamadeiras utilizadas para dar água e chás para bebês recém-nascidos (LENNOZ-ROLAND, 1999). Após a recuperação da mãe, ela era trazida para juntos dos filhotes e então eram alimentados com o colostro pela mamada. Para os que eram órfãos, foi prescrita alimentação artificial (BARRETO; PRESTES, 2004).

Figura 18 - Alimentação artificial por meio de mamadeiras em neonato canino.



Fonte: Autora (2018).

3.2.8 Neoplasias mamárias

Os atendimentos de pequenos animais com nódulos mamários eram avaliados clinicamente de acordo com número, consistência e tamanho. Para que se pudesse estabelecer um tratamento e um diagnóstico prévio, eram solicitados os exames citopatológico e de radiografia torácica. Dentre as principais vantagens do citopatológico a rapidez e a simplicidade se destacam, além do fato de ser um método seguro, que não proporciona riscos à vida do paciente, não requerendo equipamento sofisticado, sedação ou anestesia para sua realização (TVEDTEN, 1981; MILLS; GRIFFITHS, 1984; COWELL, TYLER, 1989, MILLS, 1989; PETERSON, COUTO, 1994; WELLMAN, 1996; GUEDES et al. 1997). O exame de raio X era solicitado para investigar a possibilidade de metástase como parte da avaliação inicial do paciente com possível neoplasia (MORRIS; DOBSON, 2007).

Os pacientes atendidos foram todos caninos, sendo 7 fêmeas e 2 machos. Os diagnósticos citopatológicos foram: mesenquimal maligno, carcinoma mamário, tumor de mama misto, carcinoma de células escamosas ou basoescamoso, neoplasia de células basais de origem folicular, carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado, melanoma, lipoma, displasia mamária e metástase de tumor de mama misto.

O diagnosticado como mesenquimal maligno foi encaminhado para a clínica cirúrgica de pequenos animais, pois não era considerado tumor mamário, portanto, não era de responsabilidade do setor de reprodução animal. Um dos lipomas, que não estava associado a

nenhuma das outras neoplasias não foi instituído qualquer tratamento ou intervenção, pois não trazia nenhum prejuízo ao animal.

O tratamento instituído para as demais neoplasias foi a mastectomia total de uma das cadeias, tendo em vista que nenhum dos casos havia somente um nódulo na cadeia mamária e posterior mastectomia da segunda cadeia mamária após 6 meses da retirada da primeira, quando as duas estavam afetadas. Concordando com a literatura que descreve a excisão cirúrgica como o tratamento ideal em cadelas com tumor de mama quando realizado em tempo de proporcionar a cura do animal (GOMIDE, 2011). Todos os animais que o tratamento era cirúrgico foram realizados hemograma, bioquímico e avaliação cardíaca completos previamente.

4 CONCLUSÃO

O estágio curricular obrigatório proporcionou como um todo o aperfeiçoamento dos conhecimentos na área da reprodução animal, possibilitando a complementaridade adquirida em toda a graduação. Durante o estágio foi possível perceber todo o planejamento necessário para que um futuro produto seja produzido da melhor maneira possível, sem maiores intercorrências. Além do crescimento profissional, o estágio curricular obrigatório foi uma grande oportunidade pessoal, pois nos dois locais estagiados o número de colaboradores era considerável, agregando conhecimentos em diversas áreas para que de forma sincrônica pudessem gerar os melhores resultados possíveis.

REFERÊNCIAS organizar as referencias e conferir, não achei algumas

- ALLEN W. E. et. al. **Fertilidade e Obstetrícia Equina**. São Paulo: Varela, 1994.
- ALLEN, W. E. **Fertilidade e obstetrícia no cão**. São Paulo: Varela, p. 68. 1995.
- ALVARENGA, Marco Antonio; PAPA, Frederico O.. Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. **Rev Bras Reprod Anim Supl**, Belo Horizonte, v. 6, n. 1, p.204-209, dez. 2009.
- AMANN R, KATZ D. F. Reflectionson CASA after 25 years. **J Androl**, v.25, p.317-325, 2004.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B.W. Principlesofcryopreservationand review ofcryopreservationonstallionspermatozoa. **JournalofEquineVeterinary Science**, v.7, p. 145-173, 1987.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoalfunction. In: McKinnon A. O.: VOSS, J.L. **Equine reproduction**. 1. ed. Philadelfia: Lea &Febiger, 1993. cap. 80, p. 715-745.
- ARRUDA R. P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóideequino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000. 121f. **Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo**, São Paulo, SP, 2000.
- ARRUDA, R. P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p.145-151, abril/junho, 2011.
- BADAWY, A. A.; ABDELHAFEZ, A. A.; ABUZEID, A. A. Finasteride for treatment of refractory hemospermia: Prospective placebo-controlledstudy. **International Urology and Nephrology**, v.44, n. 2, p. 371-375, 2012.
- BARRETO, Christianne Silva; PRESTES, Nereu Carlos. Imunidade e Nutrição Neonatal Can: Revisão da Literatura. **Medvop Revista Científica de Medicina Veterinária: Pequenos Animais e Animais de Estimação**, J, v. 2, n. 5, p.57-60, jan. 2004.
- BAUMBER, J.; V O, A.; SABEUR, K; BALL, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, p.1025-1033, 2002.
- BAUMGARTNER, M.; BLUM, R.; **L-carnitine and sperm quality**. In: L-carnitine in animal nutrition. Basel: Lonza, p. 1-6, 1997.
- BERTOL, M. A. F. **Estágio curricular supervisionado em reprodução animal**. Trabalho apresentado para conclusão de curso de medicina veterinária da Universidade Federal do Paraná. 2009.
- BLOM E. The ultrastructureof some characteristicspermdeffectsand a proposal for a new classificationofthe Bull spermogram. **NordVetMed**, v.25, p.383-339, 1973.
- BRITO, L. F. C. Evaluationofstallionsperm morphology. **Clin Techn EquinePract**, v.6, p.249-264, 2007.
- CAIADO, J. R. C. et al. Tratamento de éguas receptoras de embriões visando a sua utilização no segundo dia pós-ovulação. **Rev Soc Bras Zootec**, v.36, p.360-368, 2007.
- CALOGERO, A. E. et al. Correlation between intracellular A M P content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. **Human reproduction**, v. 13, n. 4, p. 911-915, 1998.
- CHAVES, Marcela Silva. **NEONATOLOGIA EM CÃES E GATOS: ASPECTOS RELEVANTES DA FISIOLOGIA E PATOLOGIA**: Revisão de literatura e relato de caso de Diprosopo Tetraoftalmo.. 2011. 42 f. Monografia (Especialização) - Curso de Medicina Veterinária, Clínica Cirúrgica e Obstetrícia de Pequenos Animais, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

- CONCANNON, P. W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, L. Canine pregnancy: predicting parturition and timing events of gestation. Recent advances in small reproduction. Ithaca: **International Veterinary Information Service**: 2004.
- CONNCANON, P. W. Physiology and endocrinology of canine pregnancy. In: MORROW, D. A. (Ed). **Current therapy in teriogenology**. 2 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986, p. 491-497.
- COSTA, F. T. Estudos da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça Brasileira de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embrião. **Rev Bras Reprod Anim**, v.26, p.252-254, 2003.
- COWELL, R. L.; TYLER, R. D. **Diagnostic Cytology of the Dog and Cat**. Am. Vet. Publ., USA. 259p. 1989.
- DAVIDSON, A. P. **Approaches to reducing neonatal mortality in dogs**. Ithaca, NY: IVIS, 2003.
- DELL'AQUA J. A. et al. Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. **Anim Reprod Sci**, v.68, p.324-325, 2001.
- FARIA, D. R.; GRADELA, A.. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 34, n. 2, p.114-122, jun. 2010.
- FELDMAN E. C.; NELSON R. W. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**, 3ª edição, Philadelphia: W. B. Saunders, 2004. p.930-1010.
- FERREIRA, N. **Tópicos de Anatomia Topográfica Veterinária**. Manole, p. 66-73, 1991.
- GINTHER, O.J. Embryology and placentation. In: GINTHER, O.J **Reproductive Biology of the Mare**. Wisconsin: Equiservices, p 345-418. 1992.
- GOMIDE, P. R. S. **Neoplasia mamária em cadelas: Aspectos clínico-cirúrgicos**. Botucatu, 2011.
- GUEDES, R. M. C.; NOGUEIRA, R. H. G.; TUDURY, E. A. **Diagnóstico citológico de lesões proliferativas e inflamatórias através da técnica de punção de tecidos com agulha fina**. Hora Veterinária, Porto Alegre, 16(96):15-21. 1997.
- GUNN, A. J.; BROOKES, V. J. Neutrophil prevalence in dismount semen samples of Thoroughbred stallions. **Clinical Theriogenology**. v.3, n.4, p.487-481, 2011.
- HEMBERG, E.; LUNDEHEIM N.; EINARSSON, S. Successful timing of ovulation using deslorelin (Ovuplant®) is labour-saving in mares aimed for single AI with frozen semen. **Reprod Domest Anim**, v.41, p.535-537, 2006.
- JARETTA, G. B. Ultrassonografia de aparelho reprodutivo em pequenos animais. In: CARVALHO, C. F. **Ultrassonografia em pequenos animais**. São Paulo: Rocca; 2004.
- JOHNSTON S. D.; KUSTRITZ M. V. R; OLSON P. N. S. **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001, 592p.
- KAWAKAMI, E. et al. High plasma estradiol-17beta levels in dogs with benign prostatic hyperplasia and azoospermia. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Science**, v. 63, n. 4, p. 407-12, 2001.
- KUMI-DIACA, J.; BADTRAM, G. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro biosay for canine semen. **Theriogenology**, v.41, p.1355-366, 1994.
- LEÃO, Karen Martins. **TÉCNICAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL**. 2003. 34 f. Monografia (Programa de Pósgraduação em Medicina Veterinária) - Curso de Medicina Veterinária, Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista (unesp), Botucatu, 2003.
- LENNOZ-ROLAND, M. Mortalidade de cães recém-nascidos: influência da gestação, parto e aleitamento. **A Hora Veterinária**, 18(107):45-51. 1999.
- LIRA, Rodrigo Araújo; PEIXOTO, Gislayne Christianne Xavier; SILVA, Alexandre Rodrigues. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO EM EQUINOS: REVISÃO. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 3, n. 4, p.132-140. 2009.

- MACÊDO, Iara Nóbrega. **AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA E ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER EM GARANHÕES QUARTO DE MILHA**. 2017. 46 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Paraíba., Areia, 2017.
- MACINTIRE, D. K. et al. **Manual of Small Animal Emergency and Critical Care Medicine**, Baltimore: Lippincott Williams e Wilkins, p.341-352. 2005.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A. Centrifugation of stallion sêmen and its stora geen large volume straws. **J. Reprod. Fertil.**,supl.27, p.47-51, 1979.
- MCKINNON, A. O.et al. Predictableovulation in mares treated with anim plant of the GnRH analog Deslorelin. **Equine Vet J**, v.25, p.321-323, 1993.
- MCKINNON, A.O., SQUIRES, E.L. Equine embryo transfer. Vet. Clin. North Am. **Equine Pract.**, v.4, p.305-33, 1988.
- MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. 5.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.52. 1992.
- MCKINNON, O. Angus.; VOSS, L. James. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- MEDEIROS, L. C. J.; MALDONATO A. L. L.; DINIZ K. V. **Avaliação ultrassonográfica da gestação em cadelas em suas diferentes faces**. Nosso Clin. 2004.
- MILLS, J. N.; GRIFFITHS, G. L. **The accuracy of clinical diagnoses by fine need leaspirati oncytology**. Aust. Vet. J. 61(8):269-271. 1984.
- MILLS, J. N. Lymph node cytology. Veterinary Clinics of North America, **Small Animal Practice, Clinical Pathology** 19(4):697-717. 1989.
- MORRIS, J.; DOBSON, J. **Oncologia em Pequenos Animais**. São Paulo: Rocca, 2007.
- MOURA, J. C. A.; MERKT, H. A **Ultra-sonografia na Reprodução Equina**. 2.ed. Salvador: Ed. Universitaria Americana,162p. 1996.
- NEELY, D.P. Reproductive endocrinology and fertility in the maré. In: Huges JP (Ed). **Equine reproduction**. Nutley, NJ: p 50-52. 1983.
- MUMFORD, E. L,et al. Use ofdeslorelin short-term implants to induce ovulation in cycling mares during three consecutive estrous cycles. **Anim Reprod Sci**, v.39, p.129-140, 1995.
- NYLAND, T. G.; MATTOON J. S. Ovaries and uterus. In: **Small animal diagnostic ultrasound**. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Company. 2002.
- OLIVEIRA, Joel Neves de. **CONTROLE REPRODUTIVO DA ÉGUA, DURANTE UMA ESTAÇÃO DE MONTA, PARA A APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL, SOB CONDIÇÕES TROPICAIS**. **Universidade Cruz Alta**, Cruz Alta, 2015
- OLIVEIRA, Sidnei Nunes de. **Novo método de colheita fracionada de sêmen para melhoria da fertilidade em garanhão com vesiculite seminal**. Compre Rural, Campo Grande, 07 fev. 2018.
- PAPA, Frederico Ozanam et al. **MANUAL DE ANDROLOGIA E MANIPULAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**. Botucatu. 60 p. 2014.
- PESSOA, M.A.; ROCHA FILHO, A. N.; CARMO, M. T. Comparison between short and longacting progesterone for treatmentof non-cycling embryo recipient mares.In: **International Symposium on Equine Embryo Transfer**, 6, Rio de Janeiro: R & W Communications, p. 85-87. 2004.
- PETERSON, J. L.; COUTO, C. G. Tumors of the skin and subcutaneous tissues, p.211 - 217. In: Birchard S.J., Sherding R.G. (ed.) **Saunders Manual of Small Animal Practice**. 1st ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1994.
- PICKETT, B. W.; AMANN, R.P.Cryopreservation of semen. In: McKINNOM, A.D.; VOSS, S.L.**Equine Reproduction**. Malvern: Lea &Febiger. p. 769 – 789. 1993.
- RAPHAEL, Cláudia Fernandes. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozoide equino refrigerado**.

2007. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- RAZDAN, P. et al. Impact of post ovulatory food deprivation on the ova transport, hormonal profiles and metabolic changes in sows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.42, n.1, p.45-55, 2001.
- RENAUDIN, C.D.; GILLIS, C. L.; TARANTAL, A. F. Transabdominal combined with transrectal ultrasonographic determination of equine fetal gender during mid gestation. In: **American Association of Equine Practitioners Annual Convention**, 43, 1997, Phoenix. Anais eletrônico Phoenix: Arizona, 1997.
- RENAUDIN, C. D. Ultrasonographic Determination of Equine Fetal Gender. **International Veterinary Information Service**. 2001.
- SAMPER, J. C.; ESTRADA, A. J.; MCKINNON, A. O. Inseminations with frozen semen. In: **Current therapy in equine reproduction**. Saint Louis: Elsevier- Saunders, p. 285-288. 2007.
- SCHOLLY, T. A. et al. Sonographic Determination of fetal gender. **American Journal of Roentgenology**, vol. 135, n. 6, p. 1161-1165, 1980.
- SILVA, Danilo Rezende et al. AVALIAÇÕES HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DE TESTÍCULOS DE BOVINOS COM DERMATITE DIGITAL. **Ciênc. Anim. Bras.**, Goiânia, v. 14, n. 3, p.391-398, jul/set. 2013.
- SILVA, L. D. M.; SILVA, R.A.; CARDOSO, R. C. S. Inseminação Artificial em Cães. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela Editora e Livraria, Capítulo 5, p.69-95. 2001.
- SILVA, Lúcia Daniel Machado da. Controle do ciclo estral em cadelas. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 40, n. 4, p.180-187, nov. 2016.
- SILVA, Yamê Fabres Robaina Sancler da. **Efeito do tratamento local de vesiculite seminal sobre a qualidade e longevidade do sêmen equino**. 2014. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2014.
- SQUIRES, E. L.; MCCUE, P. M.; VANDERWALL, D. K. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**. 51:91-104. 1999.
- STROUD, B; BÓ, GA. **The year 2009 world wide statistics of embryo transfer in domestic animals summary of the International Embryo Transfer (IETS) Data Retrieval Committee Report**. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, Suppl 1, p. 139-146, 2011.
- SWANSON, W. F.; WILDT, D. E. **Strategies and progress in reproductive research involving small cat species**. **Int. Zoo. Yb.** v. 5, p. 152-159, 1997.
- SŁOWINSKA M, et al. **Total antioxidant capacity of fish seminal plasma**. **Aquaculture**, v.400-401, p.101-104, 2013.
- TAVEIROS, A. W. **Transferência de embriões eqüinos da raça Mangalarga Marchador**. Recife-PE, 2000, 42f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Programa da Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife-PE, 2000.
- TAVEIROS, A. W. et al. Ultrasonographic monitoring of 103 recipient mares of different reproductive status during the first 30 days after embryo transfers. **Veterinary Record**, 153, 558-560. 2003.
- TIBARY, A.; RODRIGUEZ, J.; SAMPER, J. C. **Microbiology and Diseases of Semen**. In: **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. SAMPER, J.C. 2nd Ed., Saunders, Philadelphia, PA. 2009.

- TVEDTEN, H. Cytology of neoplastic and inflammatory masses, p.327- 348. In: WILLARD, M.D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G. (ed.) **Small Animal – Clinical diagnosis by laboratory methods**. 2nd ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia. 1981.
- VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L. Embryo transfer and new erassisted reproductive the cniques for horses, p 211-219. In: Youngquist R.S. & Threlfall W.R. (Eds) **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. Saunders, Missouri. 2007.
- VANNUCCHI, C. I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S. E. C. **Técnicas de citologia vaginal como método de diagnóstico da fase do ciclo estral em cadelas**. Clínica Veterinária. n. 9, p. 14-19, 1997.
- VOSS, J.I.; McKINNON, A.O. Hemospermia and Urospermia. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Saunders, p.864-870, 1993.
- WALKER, S. L. et al. The Effect of a Chronic Stressor, Lameness, on Detailed Sexual Behaviour and Hormonal Profiles in Milk and Plasma of Dairy Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p. 109-117, 2010.
- WELLMAN, M.L. Cytology and the diagnosis of neoplasia. 20th **Annual Waltham Symposium for the Treatment of Small Animal Diseases (Oncology and Hematology)**, p.11-20. 1996.
- ZAMBELLI, D. et al. Ultrasound aspects of fetal and extrafetal structures in pregnancy cats. **J Feline Med Sur**, v.4, p.95-106, 2002.
- ZELLI, R. et al. Power and Pulsed Doppler Evaluation of Prostatic Artery Blood Flow in Normal and Benign Prostatic Hyperplasia-Affected Dogs. **Reprod Domest Anim**, v. 48, n. 5, p. 768-733, 2013.